

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ÁCIDO CÍTRICO EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*)

Acadêmico: Israel Luz Cardoso

Aquidauana – MS  
Abril/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ÁCIDO CÍTRICO EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*)

Acadêmico: Israel Luz Cardoso  
Orientador: Dr. Hamilton Hisano  
Co-orientador: Dr. Ricardo Borghesi

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado – Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”.

Aquidauana – MS  
Abril/2016

C323c Cardoso, Israel Luz

Ácido cítrico em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Israel Luz Cardoso. – Aquidauana, MS: Editora UEMS, 2016.

59 p.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016.

Orientador: Dr. Hamilton Hisano.

Co-orientador: Dr. Ricardo Borghesi.

1. Ácidos orgânicos 2. Aditivo 3. Impacto ambiental 4. Fósforo I. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul II. Título. Ácido cítrico em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

**Israel Luz Cardoso**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

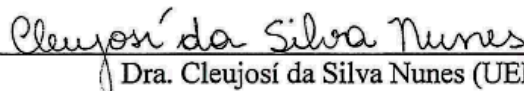
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/04/2016.



Dr. Hamilton Hisano (Embrapa Meio Ambiente)  
Orientador



Dra. Elis Regina de Moraes Garcia (UEMS)



Dra. Cleujosi da Silva Nunes (UEMS)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus (Elohin), por estar comigo nessa minha caminhada sendo meu guia, companheiro, consolador em todo o tempo. Até aqui me ajudou o Senhor, por isso, a Ele eu dou toda honra, a glória e o louvor, amém.

Aos meus Pais, familiares e amigos que participaram de certo modo desta minha trajetória. A todos eles fica aqui o meu muito obrigado.

Ao meu orientador Dr. Hamilton Hisano, pela orientação, compreensão, paciência e confiança depositada. Durante este período de aprendizagem seus ensinamentos contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Dr. Ricardo Borghesi pela disposição e orientações técnicas que ajudaram para construção deste trabalho.

À instituição de ensino Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul-UEMS e ao programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior CAPES, por me conceder esta oportunidade de realização do curso e pela bolsa de estudo.

Aos professores da Pós-Graduação, em especial, a Dra. Cristiane Meldau de Campos Amaral por ter me aceitado inicialmente como orientado.

Aos técnicos e pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, em especial, Gino, Elke, Ana Lúcia, Marisa, Juliana, Viviane, Cindi e Lidiane pelo auxílio.

À professora Dra. Arielle Cristina Arena, ao técnico José Eduardo Bozano, e a aluna Paola da Silva Balin do Laboratório de Morfologia do Instituto Biociência da Unesp de Batucatu-SP, pela disposição para realizar as análises histomorfológicas do experimento. Agradeço a vocês!

À banca de qualificação a pesquisadora Dra. Mariana Silveira Guerra Moura e Silva e a professora Dra. Cristiane Meldau de Campos Amaral, pela contribuição técnica para a construção do trabalho.

Aos meus colegas de estágio na Embrapa Meio Ambiente: Vitória, Jéssica, Giovanni, Victor e Jefferson, pela amizade, parceria e apoio na pesquisa agradeço a vocês.

Aos amigos da Vila do Brasilino em Aquidauana-MS, Willian, Erika, André e aos moradores da República Thecas, Jaguariúna, SP, em especial, ligo pela amizade construída neste período.

Aos meus amigos de mestrado Michelly, Mayara, Jucele, Marcos Paulo, Giovanni e Nicácia pela amizade e parceria no mestrado. Meu muito obrigado!

Aos meus amigos do Mato Grosso do Sul que me incentivaram durante essa trajetória Érica, Maria Aparecida, Gabriel, Marcia, Gesiel, Fernando e Alan.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	x
1. CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	5
1.1 Introdução .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivos Gerais.....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3.1 Produção aquícola mundial e nacional.....	3
3.2 Tilápia-do-nilo.....	5
3.3 Ácidos orgânicos .....	6
3.4 Uso dos ácidos orgânicos e seus sais na produção animal .....	10
3.5 Ácidos orgânicos como aditivo na alimentação animal .....	12
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
Capítulo II- Níveis de ácido cítrico em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo sobre o desempenho, digestibilidade, hematologia e histomorfologia do intestino	
Resumo .....	2
Introdução .....	2
Material e Métodos.....	5
Resultados .....	11
Discussão.....	12
Conclusão .....	18
Referências Bibliográficas .....	20
LISTAS DE TABELAS.....	25
ANEXOS .....	29
CAPÍTULO-III .....	31
Considerações finais .....	31

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Formulação e composição bromatológica das rações experimentais.....	26
Tabela 2. Valores médio e desvio padrão do pH da dieta, do estômago e intestino de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com ácido cítrico.....	27
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de desempenho dos juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com ácido cítrico. Peso inicial (PI), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico.....	27
Tabela 4. Composição corporal dos juvenis de tilápia alimentados com rações suplementadas com ácido cítrico.....	27
Tabela 5. Variáveis sanguínea dos juvenis de tilápia alimentados com rações suplementadas com ácido cítrico.....	28
Tabela 6. Valores médios dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), e demais nutrientes das rações suplementadas com ácido cítrico para juvenis de tilápia-do-nilo. Valores em % da matéria seca.....	28
Tabela 7. Altura de vilosidade (V), profundidade de cripta (C), relação vilosidade:cripta (V:C) e largura dos vilos (L) de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas experimentais durante dias.....	40 28



## RESUMO

Os ácidos orgânicos compõem um grupo de substâncias classificadas como aditivos zootécnicos e são utilizados para melhorar o desempenho dos animais. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a suplementação do ácido cítrico (0%; 1 %; 2%; 3% e 4%) nas dietas para juvenis de tilápia-do-nylo. As dietas experimentais foram formuladas para serem isoproteicas (28% de proteína digestível-PD) e isoenergéticas (3.100 kcal de energia digestível - ED kg<sup>-1</sup>). O ensaio de desempenho foi conduzido durante 40 dias, onde foram avaliados os parâmetros de desempenho, hematológicos, pH do estômago, pH do intestino e composição corporal dos animais. Os juvenis de tilápia (n= 200; 14,59 ± 0,81 g) foram distribuídos em 25 aquários (300 L) com renovação de água constante em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições. Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram utilizados juvenis de tilápias-do-nylo (n= 120; 62,35 ± 2,12 g) alimentados com rações experimentais acrescidas com 0,1% de óxido de cromo III, durante 18 dias. O pH da ração diminuiu (p<0,05) com o aumento da suplementação de ácido cítrico na ração. Por outro lado, não houve diferença (p>0,05) do pH estomacal e intestinal, entre os diferentes tratamentos. A suplementação do ácido cítrico não influenciou os parâmetros de desempenho e para os nutrientes, proteína bruta, energia bruta, extrato etéreo e cinzas das dietas experimentais. Por outro lado, os níveis de 1%, 2% e 3% de ácido cítrico proporcionaram aumento (p<0,05) na disponibilidade do fósforo, enquanto que o nível de 2% melhorou (p<0,05) a disponibilidade de cálcio, quando comparado ao controle. Além disso, houve o aumento (p<0,05) na altura, largura e profundidade de cripta para os tratamentos contendo 1% e 2% de ácido cítrico, além de incremento (p<0,05) de leucócitos totais e proteína plasmática total para os tratamentos contendo 1% e 3% de ácido cítrico. A suplementação de 2% de ácido cítrico melhora a disponibilidade de cálcio e fósforo e influencia positivamente a morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo.

**Palavras-chave:** ácidos orgânicos, aditivo, impacto ambiental, fósforo.

## ABSTRACT

The organic acids comprises in a group of substances classified as zootechnical additives and were used to improve animal performance. The aim of this study was to evaluate the citric acid supplementation (0%; 1 %; 2%; 3% e 4%) in Nile tilapia juvenile diets. The experimental diets were formulated to be isonitrogenous 28% of digestible protein (DP) and isocaloric 3,100 kcal of digestible energy (DE) kg<sup>-1</sup>. The feeding trial was conducted during 40 days, and growth performance, haematology, pH of stomach and intestine, and body composition were assessed. Nile tilapia juveniles (n = 200; 14.59 ± 0.81 g) were distributed in 25 aquaria (300 L) with continuous water renewal in an experiment design completely randomized with five treatments and five replicates. To determine the apparent digestibility coefficients (ADC) were used juvenile tilapia Nile (n = 120; 62.35 ± 2.12 g) fed experimental diets added with 0.1% chromium oxide III, for 18 days. The pH of experimental diets decreased (p<0.05) with increased levels of citric acid in the diet. On the other hand, pH of stomach and intestine did not show significant differences (p>0.05) between treatments. Dietary citric acid did not provide improvement on growth and for the nutrients crude protein, gross energy, ether extract and ashes of the experimental diets. Juvenile fed diet with 1%, 2% and 3% of citric acid showed increase (p<0.05) in phosphorus availability, while 2% provided better (p<0.05) calcium availability, when compared to control. Furthermore, villus height and width, crypt depth increased (p<0.05) in animals fed with 1% e 2% of citric acid, as well as total leukocytes and total protein plasmatic at 1% e 3% of citric acid. Supplementation of 2% of citric acid improves calcium and phosphorus availability and influenced positively the intestinal morphology of Nile tilapia juveniles.

**Keywords:** organic acids, feed additive, environmental impact, phosphorus.

## **CAPITULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1.1 Introdução**

A aquicultura é uma das principais alternativas para suprir a crescente procura por pescado e proteína de alta qualidade. Para atender esta demanda, os sistemas intensivos de produção são preconizados, objetivando alta produtividade com a utilização de elevada densidade de indivíduos estocados por área (FOSS et al., 2003; ABDEL-FATTAH & EL-SAYED, 2006; FROES et al., 2012). Por outro lado, a elevada densidade de estocagem, o uso de rações desbalanceadas e o excesso de alimento comprometem a produção e podem gerar perdas econômicas, tanto pelos desperdícios de rações como por doenças que podem acometer os peixes (FURUYA et al., 2001; URBINATI et al., 2004; CYRINO et al., 2010).

Os antibióticos e quimioterápicos estão entre os produtos mais utilizados para a prevenção e controle de doenças na aquicultura. Entretanto, o desenvolvimento de bactérias resistentes e os riscos de contaminação cruzada para os seres humanos resultaram na proibição do uso destes compostos em dietas para peixes em vários países (WESTON, 1996; KHAJEPOUR et al., 2012). Em função das restrições, o uso dos ácidos orgânicos em dietas para animais de interesse zootécnico têm recebido especial atenção no setor agropecuário.

Os ácidos orgânicos e seus sais estão incluídos na classe dos aditivos zootécnicos utilizados na produção animal como acidificante das dietas. São conhecidas três vias diferentes de ação dos ácidos orgânicos na dieta animal: alimentação, trato gastrointestinal e metabolismo (LÜCKSTÄDT, 2008). Na alimentação, a inclusão dos ácidos orgânicos têm por objetivo promover a redução do pH a níveis que podem inibir o crescimento microbiano e aumentar o tempo de conservação (PARTANEN & MROZ, 1999). No trato gastrointestinal, os ácidos orgânicos auxiliam na redução do pH do meio, em consequência, podem aumentar a digestão e absorção de nutrientes e/ou atuarem como moduladores da microbiota gastrointestinal (PARTANEN & MROZ, 1999; SCHÖNER, 2001; LÜCKSTÄDT, 2008). No metabolismo, alguns ácidos orgânicos podem contribuir como fonte de energia para as células da

mucosa do intestino e/ou beneficiar as ações das enzimas digestivas do estômago e do intestino (DIBNER & BUTTIN, 2002).

A suplementação dos ácidos orgânicos e seus sais, tais como os ácidos: fórmico, fumárico, cítrico e láctico, tem apresentado efeitos positivos na saúde, desempenho e digestibilidade para animais terrestres de produção comercial (RUNHO et al., 1997; MAIOKA et al., 2004; DE FREITAS et al., 2006; VIOLA et al., 2007; GHELER, 2009).

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido cítrico tem sido amplamente utilizado na dieta animal, devido às características únicas como sabor agradável, capacidade tampão, potencial de acidificação e menor custo em relação aos outros ácidos orgânicos (HOSSAIN et al., 2007; FAGBENRO; FASAKIN, 1996). Como aditivo zootécnico, o ácido cítrico apresenta eficácia para reduzir o pH da ração e gastrointestinal, controlar a microbiota intestinal e aumentar a biodisponibilidade e absorção de nutrientes como o P e N (BOILING et al., 2000; SUGIURA et al., 1998; LÜCKSTÄDT, 2008).

Na aquicultura é crescente a investigação do uso de ácido cítrico como suplemento na dieta dos peixes e os recentes estudos têm registrado resultados positivos no crescimento, conversão alimentar, biodisponibilidade de minerais, absorção e retenção do fósforo (SARKER, 2007; BARUAH et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007; KHAJEPOUR, 2012).

A tilápia-do-nilo é uma das principais espécies de peixes de interesse econômico e com produção significativa no cenário mundial. Porém, poucas pesquisas foram desenvolvidas com o uso do ácido cítrico como suplemento na ração para esta espécie. Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação dos níveis de ácido cítrico na ração para juvenis de tilápia-do-nilo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o efeito da suplementação de ácido cítrico em ração para juvenis de tilápia-do-nilo.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar o desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia alimentados com rações contendo níveis de inclusão do ácido cítrico;
- Verificar os efeitos nos parâmetros hematológicos e morfologia intestinal dos animais suplementados com níveis de inclusão do ácido cítrico.
- Determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta, energia bruta, extrato etéreo, cinzas, cálcio e fósforo das rações suplementadas com ácido cítrico.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Produção aquícola mundial e nacional**

No cenário mundial, a aquicultura se destaca no setor da produção animal, como uma atividade que permanece com crescimento constante (FAO, 2014). Este desenvolvimento tem sido impulsionado por uma combinação de fatores, tais como o crescimento populacional, o aumento da renda, a urbanização, a expansão da produção e distribuição mais eficiente. Estimativas preliminares em 2012 apontam o aumento no consumo *per capita* de pescado no cenário mundial, passando de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg no consumo mundial (FAO, 2014).

Entre os anos de 2000 a 2012 a produção mundial do setor aquícola apresentou crescimento anual de 6,2%, saltando de 32,4 milhões para 66,6 milhões de toneladas produzidas; estima-se que no ano de 2013 foram produzidas 70,5 milhões de toneladas de pescado, o que corresponde à quase metade de todo o pescado destinado para consumo humano (FAO, 2014).

A maior parte do pescado produzido no mundo concentra-se na Ásia, sendo a China, o principal produtor. Estima-se que no ano de 2012, o continente asiático foi responsável por aproximadamente 88% do volume total de pescado produzido na aquicultura mundial (FAO, 2014). Os países em desenvolvimento apresentam um papel importante no abastecimento dos mercados globais e, em 2012, foram responsáveis por 61% do total de exportação de pescado produzidos pela aquicultura (FAO, 2014).

Dentre os países emergentes na atividade, o Brasil apresenta grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura. No mercado nacional, a aquicultura se estabeleceu como uma atividade de grande importância econômica do setor agropecuário e, atualmente, encontra-se presente em todas as regiões do país (IBGE, 2013).

O relatório apresentado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010) aponta uma evolução da produção aquícola no país nas últimas décadas. Entre os anos de 1980 até meados de 1994 e 1995, a aquicultura produzia 50.000 toneladas por ano. Neste período, a pesca extrativa, continental e marinha, apresentava-se como a principal fornecedora de pescado para o mercado consumidor.

Em 2005, com produção estimada em 257 mil toneladas, o Brasil ocupava 18ª posição entre os maiores produtores mundiais de pescado. Neste mesmo ano, o país passou a ser o 12º em termos de receitas geradas, com 1,4% do total, destacando-se como o segundo lugar em importância na produção aquícola da América do Sul, logo após o Chile.

A produção da aquicultura brasileira nos anos de 2008, 2009 e 2010 foi representativa no cenário mundial com 365.367, 415.649 e 479.398 toneladas, respectivamente (MPA, 2010). Segundo os dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2012) a aquicultura brasileira cresceu 43,8% entre os anos de 2007 e 2009, destacando-se no mercado nacional de produção de carnes.

Em 2013, a aquicultura brasileira produziu aproximadamente 490,5 mil toneladas, sendo que a piscicultura liderou o *ranking* da produção nacional de pescado com 392,4 mil toneladas e as principais espécies de peixes cultivadas foram a tilápia, respondendo por 43,1% do total de peixes produzido pela piscicultura, seguida pelo tambaqui (22,6%) e pelo grupo tambacu e tambatinga (15,4%) (IBGE, 2013).

O Brasil está entre os países com maior expectativa para o crescimento da piscicultura, pelo fato de possuir grandes extensões de lâminas de águas públicas represadas, clima favorável, grandes áreas territoriais, além da tendência de intensificação da produção para os próximos anos, com previsões do país se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado até 2030 (FAO, 2014).

### 3.2 Tilápia-do-nilo

Tilápia é o nome dado a um grupo de peixes dentro da família Ciclideos produzidos na aquicultura mundial (ABDEL-FATTAHM & EL-SAYED, 2006). Nativa da África, Israel e Jordânia, devido ao seu potencial para aquicultura, a produção desta espécie de peixe teve sua distribuição expandida para muitos países de diferentes climas, salinidades e sistemas de produção (BOSCOLO et al., 2002).

Na aquicultura mundial apenas quatro espécies de tilápia se destacam, sendo todas pertencentes ao gênero *Oreochromis*: a tilápia-do-nilo (*O. niloticus*), a tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*), a tilápia azul ou tilápia áurea (*O. aureus*) e a tilápia Zanzibar (*O. urolepis hornorum*) (EL-SAYED, 2006). Entre as espécies de tilápias utilizadas na aquicultura mundial, a tilápia-do-nilo, provavelmente, é a espécie mais conhecida (LIKOGWE et al., 1996). Esses peixes apresentam características facilmente reconhecíveis como corpo curto e alto, cabeça e caudas pequenas com listras verticais na nadadeira caudal e coloração metálica (GALLI & TORLONI, 1986). O hábito alimentar desta espécie é onívoro, o que torna a espécie de grande interesse para a piscicultura (CASTAGNOLLI, 1992; EL-SAYED, 2006).

O destaque alcançado por esta espécie na aquicultura mundial advém das suas qualidades que se sobressaem sobre as demais espécies de peixes de cultivo (MEURER et al., 2000). Entre as vantagens encontradas, destacam-se a rusticidade, o rápido crescimento, a boa conversão alimentar e adaptabilidade para o consumo da ração comercial desde a fase larval (HAYASHI, 1999; MEURER et al., 2000).

Em relação à qualidade da carne, esta é saborosa e muito apreciada pelos consumidores, devido às qualidades nutricionais e sensoriais do seu filé, o que impulsiona a tilapicultura no mercado mundial (HAYASHI, 1999;

MEURER et al., 2000; BOSCOLO et al., 2001; GONÇALVES, 2007). O rendimento do filé está relacionado ao peso bruto do peixe, cujos valores variam entre 25% a 40%, este é ausente de mioceptos (espinhas em forma de “Y”), o que a torna apropriada para industrialização (CYRINO & CONTE, 2004).

Alguns fatores são preponderantes para a consolidação e expansão da produção da tilápia na aquicultura brasileira, são eles: o ciclo de produção muito precoce comparado com outras espécies, a adaptação a diferentes técnicas de produção, a disponibilidade de fabricação de rações específicas e a capacidade de retorno econômico mais rápido que está associado, principalmente, com o mercado crescente para o consumo deste peixe pela população brasileira (SCORVO FILHO et al., 2010). A tilápia é uma das espécies em destaque da piscicultura brasileira, sendo a principal espécie de peixe produzida no país (IBGE, 2013).

A produção mundial de tilápias ultrapassa a escala de milhões de toneladas por ano e sua criação está em contínua expansão. Em 2010 foram produzidas aproximadamente 3,5 milhões de toneladas, superando o salmão (1,4 milhão de toneladas) e ficando atrás apenas das carpas (24,2 milhões de toneladas) (FAO, 2012). Por ser produzida em todos os continentes, totalizando 135 países, a expectativa para os próximos anos é de crescimento da produção desta espécie em todo o mundo (FAO, 2014).

### **3.3 Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos, de uma forma geral, pertencem à classe do grupo químico que contém em sua molécula a presença de uma ou mais carboxila de estrutura geral  $R-COOH$ , com grupos ou compostos derivados dos ácidos carboxílicos, aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e metabólitos intermediários (VIOLA, 2007; SOLOMONS & FRYHLE, 2002). Este produto tem sido utilizado ao longo de décadas como composto comercial alimentar, principalmente na preservação de alimentos por meio da supressão do crescimento de bolor e patógenos bacterianos, permitindo assim uma melhor utilização dos recursos alimentares, preservando a qualidade higiênica (FEFANA, 2014).



Em 2013, a demanda de mercado dos ácidos orgânicos utilizados na nutrição foi liderada pela Europa (41%), seguida pelos Estados Unidos (24%), Japão (12%), América Latina (5%), Canadá (4%) e restante do mundo (14%). Com o regulamento cada vez mais severo na Europa e em outros países para o uso dos antibióticos a utilização dos ácidos orgânicos na alimentação animal tende a aumentar nos próximos anos (FEFANA, 2014).

Na produção animal, os ácidos orgânicos estão inseridos na classe de aditivo zootécnico. A Legislação Brasileira (*Instrução Normativa MAPA nº 44, de 15 de dezembro de 2015*) define os aditivos zootécnicos como “Substâncias”, microrganismo ou produto formulado adicionado na dieta, que não é utilizada como ingrediente, que tenha ou não valor nutritivo, e que melhora as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos insumos animais, melhora o desempenho dos animais sadios e atenda as necessidades nutricionais (BRASIL, 2015).

Para o grupo dos acidificantes, a Legislação Brasileira (*Instrução Normativa MAPA nº 44, de 15 de dezembro de 2015*) define os ácidos orgânicos e inorgânicos como equilibradores da microbiota do trato digestivo, que reduzem o pH do trato digestivo superior, com objetivo de facilitar a digestão e contribuir para o equilíbrio da microbiota do trato digestivo (BRASIL, 2015).

Os ácidos orgânicos correspondem à maioria dos acidificantes mais testados com interesses comerciais, por apresentarem baixo potencial de corrosão e toxicidade quando comparados com os ácidos inorgânicos (HERMES, 2011). Os efeitos dos ácidos orgânicos na redução do pH, variam consideravelmente dependendo do seu estado de dissociação descrita pelo valor pK (LÜCKSTÄDT, 2008). O valor pKa representa a capacidade de ionização que, por sua vez, indica a força do ácido, ou seja, sua capacidade de doar prótons (PARTANEN & MROZ, 1999; LÜCKSTÄDT, 2008). Numa solução aquosa, os ácidos orgânicos fracos se dissociam e formam um equilíbrio dinâmico dependendo do pH entre moléculas de ácido não dissociado (NG & KOH, 2011).

Isto implica que, quanto menor é o valor pKa de um ácido maior a sua tendência de ionizar, o que relaciona com a sua capacidade de reduzir o pH do meio (NG & KOH, 2016). Os ácidos orgânicos usados como aditivos zootécnico

apresentam o valor pK entre 3 e 5 podem ser encontrados de duas formas físicas: sólida ou líquida (DIBNER & BUTTIN, 2002; MROZ, 2005; LÜCKSTÄDT, 2008).

As características físicas e químicas de alguns ácidos orgânicos utilizados na dieta estão apresentadas no (Quadro 1).

Quadro 01. Lista de ácidos e suas propriedades.

<b>Ácidos e sais</b>	<b>Valor pK</b>	<b>Solubilidade em água</b>	<b>Condição física</b>	<b>Odor /Sabor</b>
Fórmico	3,75	Muito bom	Líquida	Odor desagradável forte irritante, sabor azedo
Acético	4,75	Muito bom	Líquida	Odor desagradável, sabor amargo
Propiônico	4,87	Muito bom	Líquida	Emissão forte odor, sabor azedo
Lático	3,08	Bom	Líquida	Odor desagradável, sabor rançoso
Fumárico	3,03/4,44	Baixo	Sólido	Inodoro, sabor azedo
Cítrico	3,14/5,95/6,39	Bom	Sólido	Inodoro agradável, sabor azedo
Ca-formato	-	Baixo	Sólido	-
Na-formato	-	Muito bom	Sólido	-
Ca-propionato	-	Bom	Sólido	-
Ca-lactato	-	Baixo	Sólido	-

Fonte: MROZ (2005); LÜCKSTÄDT (2008).

### *Ácido cítrico*

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido cítrico e seus sais estão entre os mais testados como suplemento na alimentação animal, devido às características únicas como o sabor agradável, alta capacidade tamponante e de acidificação, além de ser um ácido relativamente barato, de baixa toxicidade e fácil assimilação (GREWAL & KALRA, 1995; BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; HOSSAIN et al., 2007). Além disso, na bioquímica, este ácido apresenta um papel importante no ciclo de Krebs, como intermediário para produção de ATP que ocorre na célula animal (LEHNINGER, 2007).

Este ácido é encontrado na maioria das frutas, sobretudo em cítricos como o limão e a laranja, seu nível de acidez é fraco e quando presente em água perde íons que, por sua vez, forma o íon de citrato (FIB, 2014). Conhecido quimicamente por ter 2-hidroxi-1,2,3 propanetricarboxílico, é representado pela forma estrutural  $C_6H_8O_7$  (DIBNER & BUTTIN, 2002; LÜCKSTÄDT, 2008, PARTANEN & MROZ, 1999) (Figura 01). Fisicamente, em temperatura ambiente o ácido cítrico é encontrado na forma cristalina, com massa molar de 192,14 g/mol e densidade de 1,67 g/mL (PARTANEN & MROZ, 1999, MROZ, 2005; SHAH et al., 2015).

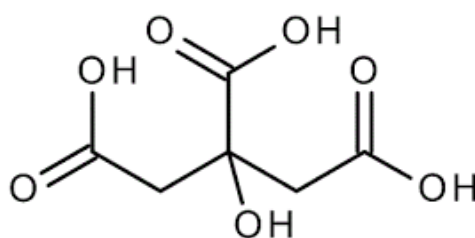


Figura 01. Fórmula estrutural do ácido cítrico.  
Fonte: Food Ingredients Brasil

O ácido cítrico e seus sais, apresentam grande utilidade na indústria farmacêutica e alimentícia (GREWAL & KALRA, 1995). A indústria alimentícia utiliza cerca de 70% da produção total (FIB, 2014). Na produção animal, o ácido cítrico tem sido utilizado como agente acidulante, conservante, estimulante e antioxidante, sendo eficaz na acidificação das rações e do trato gastrointestinal (SILVA, 2000). Como aditivo zootécnico, a suplementação do ácido cítrico na dieta tem apresentando resultados satisfatórios sobre o desempenho zootécnico dos animais terrestres e de vida aquática (RADCLIFFE et al., 1998; SUGIURA et al., 1998; PARTANEN & MROZ, 1999). Na aquicultura, estudos conduzidos com a suplementação do ácido cítrico na dieta para peixes têm demonstrado resultados positivos sobre o desempenho e a digestibilidade (BARUAH et al., 2005; BARUAH et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007; SARKER et al., 2007; KHAJEPOUR et al., 2012).

### 3.4 Uso dos ácidos orgânicos e seus sais na produção animal

Atualmente, os ácidos orgânicos e seus sais estão sendo amplamente aplicados na dieta animal e apresentam multifuncionalidades atuando em diferentes vias (LÜCKSTÄDT, 2008) (Quadro 2).

**Quadro 02.** Efeitos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal.

	Forma efetiva	Efeitos
<b>Dieta</b>	H <sup>+</sup>	Redução do pH Desnaturação de proteínas Redução no crescimento microbiano
	H <sup>+</sup> e Ânion	Efeito antibacteriano Mudança na microbiota do trato
<b>Trato Intestinal</b>	H <sup>+</sup>	Redução no pH do estômago e duodeno Aumento da atividade de pepsina
	Ânion	Disponibilização de cátions (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> )
<b>Metabolismo</b>	H <sup>+</sup> e Ânion	Fonte de Energia

Fonte: Adaptado de LÜCKSTÄDT (2008).

#### *Efeitos na dieta*

O uso dos ácidos orgânicos como conservante de grãos tem sido registrado há décadas em muitas publicações científicas e, na legislação relativa aos alimentos, são registrados como conservantes (FEFANA, 2014). A conservação dos alimentos se dá pela redução do pH. Além disso, estudos têm associado à presença de alguns ácidos orgânicos com a mudança do comportamento alimentar de algumas espécies de peixes. Esses efeitos têm sido observados em alguns parâmetros avaliados, tais como a atratividade e o consumo de ração (ADAMS et al., 1988; HIDAKA et al., 1992; GOLI et al., 2015).

#### *Efeitos no trato gastrointestinal*

No trato gastrointestinal os ácidos orgânicos atuam como agente antimicrobiano, inibindo e equilibrando o crescimento bacteriano do meio. Isso ocorre por meio da dissociação do grupo de carboxilas presente na estrutura

química dos ácidos orgânicos, nessa dissociação há a liberação de íons e prótons que podem, por meio da difusão, penetrarem a parede das células bacteriana e modificar o equilíbrio eletroquímico do meio intracelular (LÜCKSTÄDT, 2008).

No meio intracelular os íons e prótons podem alterar o gradiente de concentração iônica, comprometendo as atividades vitais das bactérias como o equilíbrio do pH citoplasmático, transporte de substrato e síntese de macromoléculas, o que pode levar ao acúmulo de íons no conteúdo intracelular e a morte bacteriana (CHERRINGTON, 1991; RUSSEL, 1992; LÜCKSTÄDT, 2008; DEFOIRDT et al., 2009) (Figura 2).

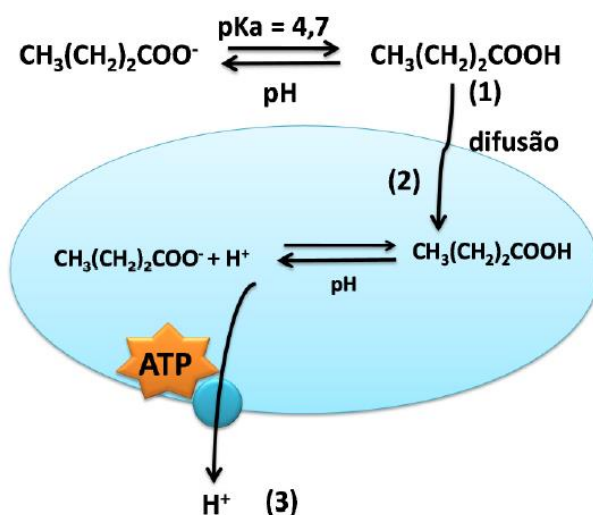


Figura 2. Mecanismo da atividade bacteriostática de ácidos orgânicos (ácido butírico, como exemplo). Os ácidos orgânicos na sua forma indissociável atravessam a membrana celular (1), e dissociam-se no citoplasma (2). Consequentemente, as bactérias têm que gastar energia para exportar o excesso de prótons (3). Adaptado de Defoirdt et al. (2009).

Estas ações antimicrobianas dos ácidos orgânicos ocorrem principalmente nas bactérias gram-negativas, pois possuem camadas mais finas de peptidoglicanos que facilitam a difusão dos íons e prótons dos ácidos orgânicos de cadeias curtas na parede bacteriana (DIBNER & BUTIN, 2005). Além disso, a acidificação diminui a capacidade de aderência à parede intestinal das bactérias com fimbrias, características de adesão encontradas em muitas bactérias gram-negativas (BELLAYER & SCHEUERMANN, 2004). Todavia, as propriedades bacteriostáticas e bactericidas dos ácidos orgânicos vão depender de alguns fatores como o estado fisiológico do organismo e das

características físico-químicas do ambiente, tempo de exposição e da dissociação dos ácidos no meio aquoso (PARTANEN, 2001; RICKE, 2003; VIOLA & VIEIRA, 2007).

No trato digestivo, a redução do pH pode resultar também em benefícios para os ganhos produtivos dos animais, por meio do maior aproveitamento dos nutrientes presentes nas rações em função do aumento das atividades enzimáticas digestivas (PARTANEN, 2001; DIBNER & BUTTIN, 2002; LÜCKSTÄDT, 2008).

### *Metabolismo*

A maioria dos ácidos orgânicos pode fornecer uma quantidade considerável de energia para o animal, como por exemplo, os de cadeias curtas que podem ser utilizados para geração de ATP no ciclo de Krebs (LEHNINGER et al., 2007; FREITAG, 2007). O ácido cítrico, juntamente com o ácido fumárico apresenta função importante na produção de energia no metabolismo da célula animal, devido à capacidade de disponibilizar aproximadamente a mesma quantidade de energia que está envolvida na geração de ATP a partir da glicose, onde 1 M desses ácidos gera 18 M ATP, assim o ácido cítrico e o fumárico podem ser comparados com a glicose em termos energéticos (MROZ, 2005; FREITAG, 2007).

### **3.5 Ácidos orgânicos como aditivo na alimentação animal**

Os ácidos orgânicos são amplamente utilizados na alimentação de aves e suínos. Na alimentação de aves, foi observado a melhor conversão alimentar ao nível indicado de 0,5% do ácido fumárico (RUNHO et al., 1997). Gama et al. (2000) relataram que a adição de acidificantes como fumárico (0,5%), láctico (5,13%), cítrico (5,44%) e ascórbico (1,2%) apresentaram efeitos positivos na qualidade do ovo e ganho de peso em poedeiras comerciais. Maioka et al. (2004) reportaram que a mistura dos ácidos fumárico, láctico e cítrico melhorou a conversão alimentar em dietas iniciais de frango de corte na presença ou ausência de promotores de crescimento. Viola et al. (2007) evidenciaram que a suplementação da mistura dos ácidos láctico, fórmico e acético promoveram efeitos similares aos obtidos com o uso de antibióticos.

Para suínos, estudos conduzidos por Falkowski e Aherne (1984) avaliaram a adição de 1,5% a 3,0% de ácido cítrico na dieta de leitões e observaram um aumento na digestibilidade do cálcio pelos mesmos. Freitas et al. (2006) observaram que a utilização de 0,84% da mistura dos ácidos orgânicos láctico, acético e fosfórico na dieta para leitões no período de 21 a 35 dias de idade melhorou a conversão alimentar e controle de *E.coli* e *Streptococcus* no trato intestinal. Gheler (2009) observou que os níveis de 0,50% e 0,75% de ácido benzoico melhoraram o desempenho em leitões no período de 28 a 70 dias.

Na aquicultura, alguns ácidos orgânicos, em especial o ácido cítrico, têm sido estudados em dietas para peixes. Para truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, Sugiura et al. (1998) e Vielma et al. (1999) evidenciaram o aumento na solubilidade e disponibilidade aparente do Ca, P e Mg. Para juvenis de *Labeo rohita*, Baruah et al. (2007) obtiveram aumento significativo na absorção de P e N no grupo de peixes alimentados com 3% de ácido cítrico. Sarker et al. (2005) relataram que a suplementação de 3% de ácido cítrico aumenta significativamente o ganho de peso e a taxa de crescimento específico do *Pagrus major*. Hossain et al. (2007) observaram melhoras no crescimento, absorção e retenção de P e menor excreção de P e N em *Pagrus major* alimentados com dietas suplementadas com 1% do ácido cítrico, 1% do ácido málico e 1% do ácido láctico. Pandey e Satoh (2008) observaram melhoras na conversão alimentar com a suplementação de 1% do ácido cítrico na dieta para truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Khajepour (2012) evidenciaram que a adição de 2% e 3% de ácido cítrico aumentou significativamente a biodisponibilidade do Ca e P no músculo e soro em Beluga *Huso huso*. Castillo et al. (2014) observaram que a dose de 1,5% de ácido cítrico pode melhorar o desempenho em crescimento de juvenis de *red drum Sciaenops ocellatus*, devido ao aumento da atividade das enzimas digestivas pepsina, tripsina, lipase e amilase. Zhu et al. (2015) evidenciaram em seus estudos que a adição de 2% do ácido cítrico aumentou significativamente o ganho de peso em juvenis de yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Zhang et al. (2016) concluíram em seus estudos que a dosagem de 0,8% a 1,6% de ácido cítrico é benéfico para o crescimento da corvina amarela *Larimichthys crocea* alimentadas com dietas ricas em proteínas vegetal.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. A., JOHNSEN, P. B., & ZHOU, H. Q. Chemical enhancement of feeding for the herbivorous fish *Tilapia zillii*. **Aquaculture**, v. 72, p. 95-107, 1998.

BARUAH K.; PAL AK.; SAHU NP.; JAIN KK.; MUKHERJEE SC.; DEBNATH D. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 8, p. 803-812, 2005.

BARUAH K., SAHU N.P.; PAL A.K.; JAIN K.K.; DEBNATH D.; MUKHERJEE S.C. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 2, p. 109-120, 2007.

BARUFFALDI, R. & OLIVEIRA, M.N. **Fundamento de Tecnologia dos Alimentos**. Vol. 3, São Paulo, ed. Atheneu, 1998.

BARD, J. Piscicultura intensiva das tilápias. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.6, n. 67, p. 24-29, 1980.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: CONFERENCIA AVISUI, 2004, Florianópolis. **Anais Florianópolis**: [s.n.], 2004. p. 1-16.

BOILING, S.D., WEBEL D.M.; MAVROMICHALIS, I.; PARSONS, C.M.; BAKER, D.H. The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 682-689, 2000.

BOSCOLO, W. R., HAYASHI, C., SOARES, C. M., FURUYA, W. M., MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*, linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Secretaria de apoio rural e cooperativismo. Instrução normativa nº 13, de 30 de Novembro de 2015. **Sistema de legislação agrícola federal**. Brasília:MAPA, 2004. Disponível em <HTTP:// estranet.agricultura.gov.brsislegis> Acesso em 04 de Maio. 2016.

CASTILLO, S., ROSALES M., POHLENZ C., DELBERT M. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, v. 433, p. 6-12, 2014.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de Água Doce**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1992. p.189.

CHERRINGTON, C. A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Organic acids: Chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 32, p. 87-108, 1991.



CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; YUJI, S.R.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A. Piscicultura e o ambiente - o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

CYRINO, J. E. P.; CONTE, L. Tilapicultura em gaiolas: Produção e economia. **Anais AquaCiência, Vitória, ES**, p. 151-171, 2004.

DEFOIRDT, T., BOON, N., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., BOSSIER, P., Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnol.** V. 27, p. 680-685, 2009.

DE FREITAS, L. S., LOPES, D. C., DE FREITAS, A. F., DA COSTA, J., CARNEIRO, A. C., de MIRANDA PENA, S., COSTA, L. F. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1711-1719, 2006.

DIBNER, J. J. E BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal Appl. Poultry Research**, v. 1, n. 23, p. 453 - 463, 2002.

EL-SAYED. Basic biology and ecology. In: ABDEL-FATTAH, M & EL-SAYED **Tilapia culture**. Oceanography Department, Faculty of Science, Alexandria: Egypt CABI, 2006. P. 25-33.

EWING, W. N.; COLE, D. J. A. **The living gut**: an introduction to microorganisms in nutrition. [S.l.]: Leicestershire, 1994.

FAGBENRO, O. A.; FASAKIN E. F. Citric-acid-ensiled poultry viscera as protein supplement for catfish (*Clarias gariepinus*). **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 13-16, 1996.

FALKOWSKI, J.F., AHERNE, F.X. Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 4, p. 935-938, 1984.

FAO. **Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Roma, p. 251. 2012. <http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>>. Acesso em: 29 Novembro 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>>. Acesso em: 03 Março de 2016.

FEFANA, Organic Acids in Animal Nutrition. European Association of Specialty Feed Ingredients and their Mixtures, Working Group Organic Acids. FEFANA, Brussels, Belgium. 2014. 97 p.

FREITAG, M. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: LÜCKSTÄDT, C. **Acidifiers in animal nutrition**. 1st ed.: Nottingham University Press, Nottingham, UK; p.1– 11, 2007.

FIB. Aplicação do ácido cítrico na indústria de alimentos. **Revista-fi**, v. 30, p. 96-103, 2014.

FOSS, A.; EVENSEN, T.H.; VOLLEN, T.; OIESTAD, V. Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolfish. **Aquaculture**, p. 215-224, 2003.

FROES, C., FOES, G., KRUMMENAUER, D., BALLESTER, E., POERSCH, L. H., & JUNIOR, W. W. Fertilização orgânica com carbono no cultivo intensivo em viveiros com sistema de bioflocos do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 34, n. 1, p. 31-39, 2012.

FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B. Fitase na alimentação da tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 924-929, 2001.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. **Criação de peixes**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1986. 118p.

GAMA, N.M.S.Q.; OLIVEIRA, M.B.C.; SANTIN, E.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Ácidos orgânicos em rações de poedeiras comerciais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 499-502, 2000.

GHELER, T. R., ARAÚJO, L. F., SILVA, C., GOMES, G. A., PRATA, M. F., & GOMIDE, C. A. Uso de ácido benzóico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2182-2187, 2009.

GREWAL, H. S., KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v.13, p. 209-234, 1995.

GOLI, S., JAFARI, V., GHORBANI, R., & KASUMYAN, A. Taste preferences and taste thresholds to classical taste substances in the carnivorous fish, kutum *Rutilus frisii kutum* (Teleostei: Cyprinidae). **Physiology & Behavior**, v. 140, p.111-117, 2015

GONÇALVES, G. S. **Digestibilidade e Exigência de Lisina, Proteína e Energia em Dietas para Tilápia do Nilo**. Dissertação (Doutorado), Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal: Centro de Aquicultura da Unesp-CAUNESP, 2007. p. 98.

HASSAAN, M.S., WAFI, M.A., SOLTAN, M.A., GODA, A.S., MOGHETH, N.M.A. Effect of dietary organic salts on growth, nutrient digestibility, mineral absorption and some biochemical indices of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus* L. fingerlings. **World Applied Sciences Journal**, v. 29, n. 1, p. 47-55, 2014.

HAYASHI, C., BOSCOLO, W. R., SOARES, C. M., BOSCOLO, V. R., & GALDIOLI, E. M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 21, n. 3, p. 733-737, 1999.

HERMES, R. G. Uso de extratos de plantas e acidificantes para suínos, o que diz a ciência e a prática atual, 2011. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/nutricao /141-p0.htm>>. Acesso em: 20 Novembro 2015.

HIDAKA, I.; ZENG, C.; KOHBARA, J.,:Gustatory responses to organic acids in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish**, v 58, p.1179–1187, 1992.

HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 73, n. 6, p. 1309- 1317, 2007.

IBGE. **Produção da agropecuária municipal**. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, p. 1-108. 2013.

INSUMOS. Conservação de alimentos por aditivos químicos. **Aditivos & Ingredientes**, 2010. p. 42-58.

KHAJEPOUR, F. & HOSSEINI, S. A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga *Huso huso* fed citric acid-supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 407-411, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. - **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo, Editora Sarvier, 1990.

LOVSHIN, L.L. **Tilapia culture in Brazil**. In: Costa-Pierce, B.A.; Rakocy, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas. Louisiana, U.S: The World Aquaculture Society. Baton Rouge. p. 133-140, 2000.

LINKONGWE, J.S.; STECKO, T.D.; STAUFFER, JR, J.R.; CARLINE, R.F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linneaus). **Aquaculture**, v. 146, p. 37- 46, 1996.

LÜCKSTÄDT, C. **Acidifiers in animal nutrition**. [S.I.]: Nottingham University Press, 2008.

MAIORKA, A., SANTIN, A. M. E., BORGES, S. A., OPALINSKI, M., & SILVA, A. V. F. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascorbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 31-37, 2004.

MEURER, F., HAYASHI, C., SOARES, C. M., & BOSCOLO, W. R. Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 479-484, 2000.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Ministério da pesca e aquicultura. Brasil, p. 1-129. 2010.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Ministério da pesca e aquicultura. Brasil, p. 1-123. 2012.

MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. **Advances in Pork Production**, v. 16, p. 169-182, 2005.

NG, W.K.; C.B. KOH, K.; KUMAR, S.; SITI- ZAHRAHA, A. Effects of organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia,

*Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**. v. 40, 1451-1466, 2009.

PANDEY, A., SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**. v.74, p.867–874, 2008.

PARTANEN, K.H., & MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 117-145, 1999.

PARTANEN, K.. I. Organic acids – Their efficacy and modes of action in pigs. In: Piva, A., Bach Knudsen K.E. and Lindberg, J.E.. **Gut Environment of Pigs Nottingham, UK**: Nottingham University Press. [S.I.]: [s.n.], 2001. p. 201- 218.

RADCLIFFE, J. S.; ZHANG, Z.; KORNEGAY, E. T. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1880-1886, 1998.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, p. 632-639, 2003.

ROCHA, E.V.H.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T. Utilização de ácidos orgânicos e fitase em dietas para leitões na creche. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 719-724, 2008.

RUNHO, R. C., SAKOMURA, N. K., KUANA, S., BANZATTO, D., JUNQUEIRA, O. M., & STRINGHINI, J. H.. Uso do ácido orgânico (ácido fumárico) nas rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 6, p.1183-1191, 1997.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, 1992.

SARKER, M.S.A., SATOH, S., KIRON, V. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment- friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**. v. 248, p. 3-11. 2005.

SARKER M.S.A., SATOH S. & KIRON, V. Inclusion of citric acid and/or acid-chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 262, p. 436- 443, 2007.

SCORVO FILHO, J. D., FRASCÁ-SCORVO, C. M. D., ALVES, J. M. C., & SOUZA, F. R. A. D. A. Tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 39, p. 112-118, 2010.

SCHÖNER, F. J. Nutritional effects of organic acids. In: BRUFAU, J. **Feed manufacturing in the Mediterranean region**. Zaragoza: Improving safety: From feed to food Conference of Feed. Manufacturers of the Mediterranean, 2000/03/22-24, 2001. p. 6-55.

SHAH, S.Z.H., M. AFZAL, S.Y. KHAN, S.M. HUSSAIN AND R.Z. HABIB, Prospects of using citric acid as fish feed supplement. *Journal Internacional of Agriculture & Biology*, v. 17, p. 1–8, 2015.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1 e 2, 2002.

SUGIURA, S.H.; DONG, F. M.; HARDY, R.W. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. **Aquaculture**, v. 160, n. 3, p. 283-303, 1998.

URBINATI, E. C., ABREU, J. S., CAMARGO, A. C. S., LANDINES, M. A. P. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, n. 1, p. 389-400, 2004.

VIELMA, J.; RUOHONEN, K., LALL, S.P. Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 5, p. 65–71, 1999.

VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1097-1104, 2007.

WESTON, D. P. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: BAIRD, D.; BEVERIDGE, M.V.M.; KELLY, L.A.; MUIR, J.F. **Aquaculture and Water Resource Management**. [S.l.]: Blackwell, Oxford, 1996. p. 140-165.

ZHU, Y., DING, Q., CHAN, J., CHEN, P., & WANG, C.). The effects of concurrent supplementation of dietary phytase, citric acid and vitamin D3 on growth and mineral utilization in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, v.436, p.143-150, 2015.

ZHANG, H., YI, L., SUN, R., ZHOU, H., XU, W., ZHANG, W., MAI, K. Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. **Aquaculture**, v.453, p.147-153. 2016.

## Capítulo II

### **Desempenho, digestibilidade, hematologia e histomorfologia do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácido cítrico**

Artigo elaborado de acordo com as normas da

Revista Ciência Rural

## **Desempenho, digestibilidade, hematologia e histomorfologia do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácido cítrico**

### **Resumo**

Os ácidos orgânicos e seus sais compõem um grupo de substâncias classificadas como aditivos zootécnicos e são utilizados para melhorar o desenvolvimento dos animais. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a suplementação do ácido cítrico (0%; 1%; 2%; 3% e 4%) na dieta para juvenis de tilápia-do-nilo. As dietas experimentais foram formuladas para serem isoproteicas (28% de proteína digestível) e isoenergéticas (3.100 kcal de energia digestível  $\text{kg}^{-1}$ ). O ensaio de desempenho zootécnico foi conduzido durante 40 dias, no qual foram avaliados o desempenho produtivo, parâmetros hematológicos, pH do estômago, pH do intestino e composição corporal dos animais. Os juvenis de tilápia ( $n = 200$ ;  $14,59 \pm 0,81$  g) foram distribuídos em 25 aquários (300 L) com renovação de água constante em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições. Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram utilizados juvenis de tilápias-do-Nilo ( $n = 120$ ;  $62,35 \pm 2,12$  g) alimentados com rações experimentais acrescidas com 0,1% de óxido de cromo III como marcador inerte, durante 18 dias. O pH da ração foi responsivo ( $p < 0,05$ ) ao aumento do pH na ração. Por outro lado, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) do pH estomacal e intestinal, entre os diferentes tratamentos. A suplementação do ácido cítrico não influenciou nos parâmetros de desempenho e os coeficientes de digestibilidade aparente da energia dos nutrientes, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas das dietas experimentais. Por outro lado, os níveis de 1%, 2% e 3% de ácido cítrico proporcionaram aumento ( $p < 0,05$ ) na disponibilidade do fósforo, enquanto que o nível de 2% melhorou ( $p < 0,05$ ) a disponibilidade de cálcio, quando comparado ao controle. Além disso, houve o aumento ( $p < 0,05$ ) na altura, largura e profundidade de cripta para os tratamentos contendo 1% e 2% de ácido cítrico, além de incremento ( $p < 0,05$ ) de leucócitos totais e proteína plasmática total para os tratamentos contendo 1% e 3% de ácido cítrico. A suplementação de 2% de ácido cítrico melhora a disponibilidade de cálcio e fósforo e influencia positivamente a morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo.

**Palavras-chave:** Ácidos orgânicos, Aditivo, Impacto ambiental, Fósforo.

## Abstract

The citric acid and their salts are included in the class of additive and are used in animal production with effective responses on growth. The aim of this study was to evaluate the citric acids supplementation (0%; 1 %; 2%; 3% e 4%) in the diet for Nile tilapia. The experimental diets were formulated to be isonitrogenous 28% of digestible protein (DP) and isocaloric with 3,100 kcal of digestible energy (DE)  $\text{kg}^{-1}$ . The test of performance was conducted during 40 days, were evaluated the productive performance, hematology, stomach pH, intestinal pH and composition body of the animals. The Nile tilapia juveniles ( $n = 200$ ;  $14.59 \pm 0.81$  g) were distributed in 25 aquaria (300 L) with continuous water renewal in an experiment design completely randomized with five treatments and five replicates. The apparent digestibility coefficient (ADC) were determined with Nile tilapia juveniles ( $n = 120$ ;  $62.35 \pm 2.12$  g) fed experimental diets plus 0.1% chromium III oxide as an inert marker for 18 days. The pH of experimental diets decreased ( $p < 0.05$ ) with increased levels of citric acid in the diet. On the other hand, pH of stomach and intestine did not show differences ( $p > 0.05$ ) between treatments. The addition of citric acid did not affect the performance parameters and the apparent digestibility of nutrients energy, crude protein, ether extract and ashes of the experimental diets. Juveniles of Nile tilapia fed with diet supplemented with 1%, 2% and 3% of citric acid showed increase ( $p < 0.05$ ) in phosphorus availability, while 2% provided better ( $p < 0.05$ ) calcium availability, when compared to control. Furthermore, villus height and width, crypt depth increased ( $p < 0.05$ ) in animals fed with 1% e 2% of citric acid, as well as total leukocytes and total protein plasmatic at 1% e 3% of citric acid. Supplementation of 2% of citric acid improves calcium and phosphorus availability, and influenced positively the intestinal morphology of Nile tilapia juveniles.

**Keywords:** Organic acids, Feed additive, Environmental impact, Phosphorus.



## Introdução

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das principais espécies da aquicultura mundial e sua produção está distribuída em todos os continentes, totalizando 135 países (FAO, 2014). No Brasil, embora seja uma espécie exótica, a tilápia tem grande importância para o desenvolvimento da aquicultura no país. Em 2013, sua produção foi responsável por 43,1% do total da produção de pescado produzido pela aquicultura nacional (IBGE, 2013).

Na produção animal, desde a proibição de várias classes de antibióticos como promotores de crescimento em alguns países da União Europeia, o uso de produtos alternativos que possam inibir os agentes patogênicos e que estimulem o crescimento dos animais, tem se intensificado (LIM et al., 2010; SILVA et al., 2013). Neste contexto, os ácidos orgânicos e seus sais têm recebido especial atenção, como substituto dos antibióticos e estão ganhando cada vez mais projeção na produção animal (LÜCKSTÄDT, 2008; NG & KOH, 2011, FEFANA, 2014).

A redução do pH corresponde à principal ação dos ácidos orgânicos na alimentação animal e seus principais efeitos estão relacionados com a conservação da ração, aumento das respostas do desempenho zootécnico, controle do crescimento bacteriano no trato intestinal e melhorias no metabolismo (PARTANEN & MROZ, 1999; MROZ, 2005). Dentre os ácidos orgânicos mais utilizados, destacam-se os ácidos de cadeias curtas (C1-C7), tais como os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico, fumárico e o cítrico (DIBNER & BUTTIN, 2002).

O ácido cítrico e seus sais estão em destaque como agente acidulante das dietas, devido à característica única como o sabor agradável, alta capacidade tamponante, baixa toxicidade, fácil assimilação pelos animais de produção terrestres ou aquáticos e por se tratar de um ácido relativamente barato (GREWAL & KALRA, 1995; HOSSAIN et al., 2007). Para algumas espécies de peixes, a inclusão do ácido cítrico resultou em respostas positivas no

desempenho zootécnico (BARUAH et al., 2005; BARUAH et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007; SARKER et al., 2007; KHAJEPOUR et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

Embora o uso dos ácidos orgânicos e seus sais ou misturas tenha sido extensivamente estudado em vários animais terrestre, as pesquisas em animais aquáticos foram intensificadas somente nos últimos dez anos (NG & KOH, 2016). Para tilápia-do-nilo poucas pesquisas foram conduzidas com o uso dos ácidos orgânicos, em especial com o ácido cítrico, como aditivo zootécnico na ração. Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da inclusão do ácido cítrico em ração para juvenis de tilápia-do-nilo sobre o desempenho zootécnico, a digestibilidade aparente dos nutrientes e energia, hematologia e a histomorfometria intestinal.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecossistemas Aquáticos da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, realizado entre os meses de junho e julho de 2015. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA (Embrapa Meio Ambiente) Protocolo nº 004/2015.

### *Dietas experimentais*

As dietas experimentais foram formuladas para serem isoproteicas (28% de proteína digestível), com base na proteína vegetal dos farelos de soja e de trigo, e isoenergéticas (3.100 kcal de energia digestível  $\text{kg}^{-1}$ ) (Tabela 1). O ácido cítrico anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi incluído em 1%; 2%; 3% e 4% na dieta. Para elaboração da ração, os ingredientes foram processados em moinho de laboratório para atingir 0,5 mm e depois foram misturados e umedecidos com 20% de água a 50 °C e processados em moinho de carne (2,5 mm).

Posteriormente, as rações experimentais foram secas em estufa de ventilação forçada (55 °C) durante 24 horas e, em seguida, armazenadas a 7 °C.

#### *Ensaio de desempenho*

Os juvenis de tilápia-do-nilo ( $14,59 \pm 0,81$  g) foram distribuídos aleatoriamente em 25 aquários com volume útil de 300 L (oito peixes por aquário), providos de sistema de recirculação de água com filtro físico e biológico, aeração suplementar por meio de compressor de ar radial 1,0 cv/sistema, e a temperatura foi mantida constante por meio de termostato e resistência elétrica.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0%; 1%; 2%; 3% e 4%) e cinco repetições para cada tratamento. As rações foram fornecidas quatro vezes ao dia (8 h; 10h30; 14h e 16 h) em pequenas quantidades, até saciedade aparente dos peixes. O período experimental foi de 40 dias.

As variáveis de desempenho avaliadas neste experimento foram: ganho de peso (GP (g) = peso final (g) – peso inicial (g)), taxa de crescimento específico (TCE (%) =  $100 \times [(\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}) / \text{período experimental}]$ ), consumo de ração (CR (g) = alimento consumido total (g) / período experimental), conversão alimentar aparente (CAA = alimento fornecido (g) / ganho de peso (g)), taxa de eficiência proteica (TEP (%) =  $100 \times (\text{ganho de peso (g)} / \text{proteína bruta consumida (g)})$ ). Foi também calculada a taxa de retenção de proteína =  $[100 \times (\text{proteína corporal final} - \text{proteína corporal inicial}) / \text{consumo em proteína (matéria seca)}]$ .

#### *Monitoramento físico-químico da água*

Durante o período experimental, foi mensurada diariamente a temperatura ( $25,17 \pm 0,07$  °C), oxigênio dissolvido ( $5,27 \pm 0,11$  g L<sup>-1</sup>) e pH ( $7,06 \pm 0,06$ ) com auxílio de multiparâmetro

(U-50, Horiba, Minami-ku, Kyoto, Japan). A amônia total ( $0,03 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) foi mensurada semanalmente por meio de kit comercial (Hach, Loveland, CO, USA).

#### *Análise hematológica e composição centesimal do filé*

No final do período experimental dois peixes de cada unidade amostral foram submetidos à indução anestésica com benzocaína  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (banho de imersão) e a colheita de sangue foi realizada por punção caudal, com auxílio de seringas contendo EDTA (3%).

O hematócrito (Htc %) foi determinado pelo método do microhematócrito e centrifugado em centrífuga modelo NI 1807 (Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) por 5 min e  $10.000 \text{ rpm}$ . As análises de eritrócitos (Eri;  $\times 10^{-6} \mu\text{L}^{-1}$ ) seguiram o método modificado de Oliveira et al. (2008). A contagem de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, por meio do microscópio óptico, modelo BIOVAL, com objetiva de 40 vezes.

As análises de hemoglobina (Hb;  $\text{g.dL}^{-1}$ ) foram realizadas pelo método do cianeto de hemoglobina (HCN) com Kit da Labtest Diagnóstica (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). A proteína plasmática total (PPT) foi mensurada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg pela quebra do capilar de microhematócrito logo acima da camada de leucócitos, após a leitura do hematócrito.

Após a colheita de sangue, os animais receberam uma superdosagem de benzocaína a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (banho de imersão) e, posteriormente foram eutanasiados. Foram colhidos músculo, fígado, intestino e vísceras de 10 animais por tratamento. As análises de matéria seca, proteína bruta, energia bruta ( $\text{kcal kg}^{-1}$ ), extrato etéreo e cinzas do músculo (inicial e final) foram realizadas de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000).

## 200 *Análises do pH da ração, estômago e intestino*

201 Para determinação do pH das dietas, 10 g de cada dieta experimental foram misturados  
202 com 30 mL de água deionizada e homogeneizada durante 5 minutos. Após 30 minutos, o pH  
203 foi medido com medidor de pH digital (Delta 320 Mettler-Toledo, Suíça). Para análise do pH  
204 estomacal e intestinal foi considerado o tempo de jejum de 14 horas, com base nos estudos de  
205 CARNEIRO (1990), DIAS-KOBERSTEIN et al. (2005), MOURA et al. (2012).

206 Para mensuração do valor de pH foi colhido cerca de 0,5 g de cada órgão fresco  
207 (fluidos e sólidos) de dois peixes por repetição totalizando dez animais por tratamento. As  
208 amostras foram homogeneizadas com 4,5 mL de água destilada no homogeneizador dispersor  
209 (T10 Ika, Staufen, Germany) por 5 min e após 30 minutos o pH foi mensurado usando o  
210 medidor de pH (Delta 320 Mettler-Toledo, Switzerland) de acordo com a metodologia  
211 proposta por Chang et al. (2006).

## 212 *Análise histológica*

213 Para análise histológica do intestino foram utilizados 30 peixes (seis peixes por  
214 tratamento). Os peixes foram submetido a uma superdosagem de benzocaína a 200 mg L<sup>-1</sup>  
215 (banho de imersão) e, posteriormente eutanasiados. Fragmentos com aproximadamente dez  
216 centímetros da região inicial do intestino foram devidamente colhidos, em seguida, realizada  
217 uma lavagem interna com solução de formalina a 10% para limpeza total dos intestinos.  
218 Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente durante 24 horas e imersas em  
219 álcool etílico 80%, onde permaneceram até o momento do processamento. Os fragmentos  
220 foram submetidos à desidratação, diafanização e emblocamento em parafina. Por ato  
221 contínuo, foram realizados os cortes 4 µm em micrótono automático (Leica®). Em seguida  
222 procedeu-se a desparafinização, reidratação e coloração pela técnica de Hematoxilina e  
223 Eosina (HE), conforme o protocolo histotécnico padrão. Após a preparação das lâminas,

realizaram-se as medidas morfométricas dos vilos, profundidade de cripta, relação altura e profundidade de cripta e largura dos vilos, foram realizadas 45 mensurações para cada lâmina. A leitura das lâminas histológicas foi realizada com o auxílio de microscópio ótico (Zeiss, Stemi 2000) acoplado ao sistema analisador de imagens (Toupview, DCM 510).

#### *Determinação do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA)*

No ensaio digestibilidade, foram utilizados 120 animais ( $62,35 \pm 2,12$  g) que já estavam adaptados à ração experimental devido ao ensaio de desempenho. Os animais foram distribuídos em dez gaiolas com volume útil de 80 L (15 peixes por gaiola). As gaiolas ficaram submersas parcialmente em duas caixas de polietileno com capacidade útil de 2.000 L (cinco gaiolas por caixa), que continham sistema de recirculação, temperatura controlada por resistências 300 W/caixa e aeração suplementar por meio de soprador radial 1,0 cv/sistema. As dez gaiolas foram divididas em dois grupos de coleta, onde as fezes de cada grupo foram coletadas em dias alternados. O período experimental teve duração de 18 dias.

Para avaliação da digestibilidade aparente foi acrescido 0,1% de óxido de cromo III ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) nas dietas experimentais. Os animais foram mantidos durante o dia nas gaiolas de alimentação, sendo alimentados com as rações teste até saciedade aparente das 8h às 16h30, com maior frequência durante o período vespertino. Ao final da tarde, os peixes eram transferidos para os coletores, com capacidade útil de 200 L, onde permaneciam até a manhã do dia seguinte. Em laboratório, as amostras foram centrifugadas e, posteriormente, acondicionadas em placas de petri e levadas a refrigeração com temperatura a 7 °C.

No final do experimento as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e secas em estufa de circulação de ar forçada a 55 °C por 24 horas. Após a secagem foram maceradas e armazenadas para posterior análise da composição química, segundo AOAC (2000), no tocante a matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, fibra e o óxido cromo, segundo a metodologia descrita por Silva (2005).

A qualidade da água do sistema de alimentação foi monitorada diariamente pela manhã (concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e pH) com auxílio de um multiparâmetros (modelo U-50) e semanalmente (amônia) através de kit colorimétrico (kit Hach).

Foram determinados o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas, energia bruta, cálcio e fósforo. Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente das rações foi utilizada a equação citada por Cho et al. (1985).

$$CDA (\%) = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{\% Id}{\% If} \times \frac{\% Nf}{\% Nd} \right) \right]$$

Onde:

CDA = coeficiente de digestibilidade aparente;

Id = concentração de cromo na ração;

If = concentração de cromo nas fezes;

Nd = nutriente na ração;

Nf = nutriente nas fezes.

#### *Análise estatística*

Para a análise estatística dos resultados experimentais foi aplicado o teste de normalidade e as médias foram submetidas análise de variância (ANOVA), e quando significativas aplicadas ao teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas no programa estatístico SAS (SAS, 2001).

## 269   **Resultados**

270           O pH das dietas experimentais apresentou diferença entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). No  
271   entanto, no trato gastrointestinal não foram observadas diferenças ( $p>0,05$ ) entre os  
272   tratamentos para os valores de pH (Tabela 2).

273           Os resultados das variáveis: ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento  
274   específico, taxa de eficiência proteica, taxa de retenção proteica e consumo alimentar não  
275   apresentaram diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 3).

276           Não foram observadas diferenças ( $p>0,05$ ) para composição corporal dos juvenis de  
277   tilápias alimentados com as rações contendo diferentes níveis de ácido cítrico para umidade,  
278   proteína bruta e cinzas (Tabela 4).

279           Os resultados de hemoglobina, hematócrito, CHCM e eritrócitos não apresentaram  
280   diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos. Os tratamentos que continham 1% e 3% de inclusão  
281   de ácido cítrico apresentaram os maiores valores para o número de leucócitos, diferindo  
282   ( $p<0,05$ ) dos tratamentos controle e 4%. Esses mesmos resultados foram observados para a  
283   proteína plasmática total (Tabela 5).

284           Não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) para os coeficientes de digestibilidade aparente  
285   da matéria seca, proteína bruta (PB), energia bruta (EB), extrato estéreo (EE), cinzas e fibra,  
286   entre as rações suplementadas com diferentes níveis do ácido cítrico. Entretanto, foi  
287   observado diferença ( $p<0,05$ ) para fósforo, onde os tratamentos 1%, 2% e 3% apresentaram  
288   maiores valores diferindo significativamente do tratamento controle e para cálcio, no qual, o  
289   tratamento 2% ( $p<0,05$ ) diferiu significativamente do tratamento controle (Tabela 6).

290           Os parâmetros histomorfométricos apresentaram diferença ( $p<0,05$ ) entre os  
291   tratamentos. Para altura dos vilos, as dietas suplementadas com 1% e 2% de ácido cítrico  
292   apresentaram maiores valores diferindo ( $p<0,05$ ) entre os tratamentos, o mesmo foi observado  
293   para relação vilosidade:cripta, profundidade de cripta e largura dos vilos (Tabela 7).



## Discussão

O pH das rações experimentais foram responsivos ao aumento da suplementação de ácido cítrico ( $p < 0,05$ ), sendo que os maiores níveis promoveram menores valores de pH e, possivelmente, esse processo de acidificação pode prevenir e/ou inibir o crescimento e a proliferação de microrganismos indesejáveis. O ácido cítrico e seus sais são comumente empregados para a redução do pH dos alimentos, a fim de limitar o crescimento bacteriano, visto que, esses microrganismos têm requisitos específicos de pH para o crescimento ótimo e são incapazes de crescer sob condições ácidas extremas como pH abaixo de 4,5

Por outro lado, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) para o pH do estômago e intestino. Estes resultados corroboram o relatado por Ng et al. (2009) que observaram redução do pH da dieta com a inclusão de 2% de diformiato de potássio, porém, não houve diferença para os valores do pH estomacal ( $p > 0,05$ ) para tilápia (*Oreochromis* sp.). Lückstädt. (2008) observou que a inclusão de 1,35% de diformiato de potássio na dieta não teve efeito sobre o pH do trato gastrointestinal para o salmão do atlântico (*Salmon salar*).

Os resultados do presente estudo podem ser explicados, em parte, pelo período de aferição do pH destes órgãos, após a última alimentação. Optou-se por avaliar o pH, considerando o estômago e intestino vazios na tentativa de verificar o efeito prolongado do ácido pós-alimentação. No estudo realizado por Castillo et al. (2014), foi observado que seis horas pós-alimentação, não houve efeito do ácido cítrico na redução do pH intestinal do *red drum* (*Sciaenops ocellatus*) alimentado com dietas contendo 0,75% e 1,5% de ácido cítrico, possivelmente porque este ácido pode ter sido metabolizado nas primeiras horas. Considerando as propriedades metabólicas do ácido cítrico como substrato intermediário para gerar energia no ciclo de Krebs, o ácido cítrico pode ter sido metabolizado nas primeiras horas pós-alimentação, assim como observado por Castillo et al. (2014) para *red drum*.

A suplementação de diferentes níveis de ácido cítrico não proporcionou incremento significativo ( $p>0,05$ ) sobre os parâmetros de desempenho produtivo para tilápia-do-nylo, após o período experimental de 40 dias. Estes resultados corroboram os verificados por Vielma et al. (1999) que também não observaram melhorias significativas no desempenho de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com rações contendo 0,48% e 1,6% de ácido cítrico. Nesse mesmo sentido, Ng et al. (2009) não detectaram diferença significativa para os parâmetros de desempenho para tilápia vermelha alimentadas com rações suplementadas com 0,1%, 0,2% e 0,3% da mistura de ácidos orgânicos OAB (Organic Acids Blend), apenas para 0,2% de diformiato de potássio quando comparado com a mistura dos ácidos orgânicos.

Respostas contraditórias foram relatadas por Zhu et al. (2015), os quais observaram que a inclusão de 2% ácido cítrico aumentou resposta para a taxa de crescimento do *yellow catfish* (*Pelteobagrus fulvidraco*). Resultados positivos sobre o crescimento também foram relatados por Afzal et al. (2016), onde observaram que a inclusão de 2% ácido cítrico melhorou o desempenho de juvenis de *rohu* (*Labeo rohita*) e por Zhang et al. (2016) que concluíram que a suplementação de 0,8% a 1,6% de ácido cítrico em dietas para *yellow croaker* (*Larimichthys crocea*) melhorou o crescimento.

A redução do pH corresponde a principal ação dos ácidos orgânicos na dieta, mas os impactos sobre o desempenho zootécnico, controle de crescimento bacteriano e melhorias no metabolismo dependem da acidificação do conteúdo do trato gastrointestinal, pela alteração do pH (PARTANEN & MROZ, 1999; MROZ, 2005). Esse efeito pode explicar os resultados de desempenho, uma vez que não houve diferença no pH gastrointestinal dos animais que receberam o ácido cítrico nas dietas, quando comparados aos não suplementados. Outros fatores podem explicar os resultados deste estudo, sendo eles: o tipo de ácido orgânico, nível

de inclusão, composição da dieta, espécie testada, cultivo e manejo alimentar (METZLER & MOSENTHIN, 2007; LIM, et al., 2010).

A digestibilidade aparente e a composição corporal para umidade, cinzas, proteína bruta, energia também não foram influenciadas pela suplementação do ácido cítrico na dieta. Resultados semelhantes foram registrados no estudo realizado por Ng et al. (2009) para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), Zhu et al. (2014) para o bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*), Hassan et al. (2014) para a corvina amarela (*Larimichthys crocea*) e Zhang et al. (2016) para tilápias (*Oreochromis* sp.).

Os valores de pH estomacal e intestinal podem ser uma possível razão para ausência das respostas obtidas para os resultados da digestibilidade. A redução do pH favorece a ação das enzimas no trato gastrointestinal, aumentando deste modo a digestão e absorção dos nutrientes (PARTANEN & MROZ, 1999; DIBNER & BUTTIN, 2002; LÜCKSTÄDT, 2008). Em alguns estudos foram observados essa interação na presença do ácido cítrico na dieta e as enzimas digestivas em função da acidificação do trato digestivo para algumas espécies de peixes, tais como *rohu* (*Labeo rohita*) (BARUAH et al., 2005; BARUAH et al., 2007; AFZAL et al, 2016; HUSSAIN et al, 2016), *red sea bream* (*Pagrus major*) (SAKER et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007) e beluga (*Huso huso*) (KHAJEPOUR et al., 2012).

Por outro lado, as dietas suplementadas com ácido cítrico apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na disponibilidade do cálcio e fósforo para os tratamentos 1% e 2%, quando comparado com a dieta controle. Estudos têm evidenciado a influência do ácido cítrico sobre a biodisponibilidade do cálcio (Ca) e fósforo (P) na alimentação de algumas espécies de peixes (KHAJEPOUR et al., 2012; SAKER et al., 2012; HUSSAIN et al., 2015; AFZAL et al., 2016; HUSSAIN et al., 2016; RABIA et al., 2016). Os estudos investigando a ação do ácido cítrico na dieta de peixes salientam alguns fatores que possivelmente se relacionam ao aumento da digestibilidade dos minerais. Sugiura et al. (1998) relatam que o

aumento da digestibilidade dos minerais em função do ácido cítrico é atribuída principalmente ao efeito acidificante na dieta e que isso está relacionado com a solubilização dos minerais, pois ao testar a inclusão de uma solução ácida (ácido cítrico) e outra alcalina (bicarbonato de sódio) foi observado que a disponibilidade de minerais aumenta quando as dietas são acidificadas e diminui quando a base é adicionada.

Outro fator está relacionado com a utilização do ácido cítrico como intensificador da desfosforilação do fitato “*in vitro*”, como observados nos estudos realizado por Gueguen et al. (1970), Hall et al. (1978), Yoshida et al. (1979), Nicodemos e Barrocas (1995) e Zyla et al. (1995). O mecanismo de ação do ácido cítrico está relacionado com a capacidade deste ácido em afetar fisicamente o produto químico das moléculas de fitato por meio da descomplexação dos sítios de ligações e, conseqüentemente, biodisponibilizar o fósforo e outros minerais em solução (SARKER et al., 2005, ATAPATTU & NELLIGASWATTA, 2005; SHAH et al., 2015). Considerando as possíveis associações do efeito do ácido cítrico na digestibilidade dos minerais, possivelmente, esses fatores podem explicar em parte os resultados da digestibilidade do cálcio e fósforo do presente estudo.

Os parâmetros morfométricos da mucosa intestinal também podem explicar as respostas do coeficiente de digestibilidade desses minerais, uma vez que, o aumento nas medidas histomorfométricas da mucosa intestinal refletiram em aumento da digestibilidade das dietas com 1% e 2% de ácido cítrico. O efeito hipertrófico das vilosidades e microvilosidades da mucosa intestinal podem resultar numa absorção mais eficaz dos nutrientes, pois quanto maior o número de células, maior é a superfície de absorção e o transporte dos nutrientes nas bordas em escovas do intestino delgado (YOUNES et al., 1996; MAIORKA et al., 2004; PROSZKOWIEC-WEGLARZ & ANGEL, 2013).

As respostas histomorfométricas do presente estudo podem indicar que o ácido cítrico exerceu um papel benéfico sobre a morfologia do intestino, preservando a mucosa intestinal

para os grupos de peixes que foram alimentados com as dietas contendo 1% e 2% do ácido cítrico. As células epiteliais são bastante dinâmicas e estão em constante renovação, o que exige grande quantidade de energia (JUNQUEIRA et al., 2006; GAO et al., 2011). Os ácidos orgânicos utilizados na alimentação animal apresentam elevado valor energético e muitos deles, quando presentes na dieta, atuam como fonte de energia preferencial para a proliferação, crescimento e a integridade das células intestinal (EWING & COLE 1994; SAKATA et al., 1995; DIEBOLD & EIDELSBURGER, 2006; FREITAG & LÜCKSTÄDT, 2007).

O ácido cítrico, por sua vez, participa do metabolismo como substrato intermediário e, quando presente na dieta, pode ser dirigido para o ciclo de Krebs para produção de energia, por sua capacidade em disponibilizar aproximadamente a mesma quantidade de energia que está envolvida na geração de ATP a partir da glicose, onde 1 M desse ácido gera 18 M ATP, assim o ácido cítrico pode ser comparados com a glicose em termos energéticos (MROZ, 2005; FREITAG, 2007; LEHNINGER, 2007; PARTANEN & MROZ, 1999; FREITAG, 2008). Desse modo, possivelmente o ácido cítrico pode ter contribuído energeticamente para o desenvolvimento das células intestinais, demonstrando que este, provavelmente foi um dos mecanismos de ação deste ácido no estudo. Dados sobre os efeitos dos ácidos orgânicos sobre a morfologia intestinal em animais aquáticos são escassos (NG & KOH, 2016). Este estudo pode conter as primeiras informações sobre o efeito positivo da suplementação do ácido cítrico sobre a morfologia intestinal de juvenis da tilápia-do-nilo.

Os resultados das análises de hemoglobina, eritrócitos não apresentaram diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores dos parâmetros hematológicos estão de acordo com os apresentados para a espécie por Barros et al. (2014) em condições de laboratório. Diferença significativa ( $p<0,05$ ) foi observada para leucócitos e proteína plasmática total entre os grupos de peixes que receberam a dosagem de 1% e 3% quando comparado com aqueles que

receberam o tratamento controle e 4%. Os leucócitos são um grupo de células do sistema imunológicos responsáveis pela defesa do organismo contra infecções ou substâncias estranhas (TAVARES-DIAS & MORAES, 2015). As células envolvidas nesse conjunto de respostas são os neutrófilos, heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e trombócitos, e desempenham a função de defesa contra micro-organismos, respostas alérgicas e citosinas inflamatórias e fagocitose (BOLS et al., 2010; TAVARES-DIAS & MORAES, 2015).

Dentre as diversas proteínas que compõem grande parte do plasma sanguíneo, as duas principais são albumina e as globulinas (THOMAS, 2000; MELO et al., 2009). As globulinas, também denominada de imunoglobulinas, abrangem as proteínas que atuam no sistema imune e desempenham papel importante nos mecanismos de defesa imune humoral por sua característica de reconhecer e interagir com componentes estranhos nos organismos (MELO, 2004; BILLER-TAKAHASHI & URBINATI, 2014).

Alguns estudos enfatizam a eficácia dos ácidos orgânicos no controle da microbiota gastrointestinal. Para a espécie em estudo, a tilápia, há registros de melhoria na saúde pelo uso dos ácidos orgânicos como medida preventiva de doenças por patógenos. Ng et al. (2009) observaram que a dosagem de 0,1% e 0,3% do AOB ou 0,2% do diformiato de potássio reduziu a taxa de mortalidade de juvenis de tilápias após o desafio com *S. agalactiae*. Nesse mesmo sentido, Koh et al. (2014) registraram redução da taxa de mortalidade na suplementação de 0,5% de ácidos orgânicos AOB (fórmico, láctico, málico, tartárico e cítrico) e os resultados apresentaram maior eficiência dos ácidos orgânicos na proteção dos peixes à infecção por *S. agalactiae*, se comparado com a suplementação do OTC (oxitetraciclina hidratado) na mesma proporção. Abu-Elala e Ragaa (2015) observaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros imunológicos inato para as tilápias alimentadas com 0,2% e 0,3% diformiato de potássio (KDF), e redução na mortalidade 15 dias após desafio bacteriano com

442 *A. hydrophila*. Os autores relataram que o ácido orgânico foi capaz de modificar a flora  
443 microbiana do intestino, que por sua vez podem ser responsáveis pela capacidade de aumentar  
444 a resposta imune.

445       No presente estudo, houve aumento da proteína plasmática total e do leucócito total  
446 dos animais suplementados com 1%, 2% e 3% de ácido cítrico, isso pode indicar um possível  
447 efeito imunomodulador deste ácido na dieta. No entanto, estudos específicos devem ser  
448 conduzidos para certificar estas observações. A relação direta dos ácidos orgânicos com a  
449 saúde dos peixes ainda não está devidamente identificada e, possivelmente, a melhoria da  
450 saúde intestinal pode ter efeito indireto nas respostas imunológicas, pelo controle da  
451 colonização microbiológica, especialmente de bactérias patogênicas.

## **Conclusão**

A suplementação do ácido cítrico não aumentou as respostas dos parâmetros zootécnicos de desempenho e de digestibilidade de proteína e energia. Por outro lado, a suplementação de 2% de ácido cítrico melhorou a disponibilidade de cálcio e fósforo e influenciou positivamente a morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo.



## Referências Bibliográficas

- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**, 17 edição. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- ABU-ELALA, N. M.; & RAGAA, N. M. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 4, p. 621-629, 2015.
- AFZAL, M. et al. Effect of acidification in a phytase sprayed sunflower meal based diet on growth and dietary nutrient digestibility performances of labeo rohita juveniles. **Pakistan J. Zool**, v. 48, n.4, p.1165-1169, 2016.
- ATAPATTU, N.S.B.M. e NELLIGASWATTA C. J. Effects of citric acid on the performance and the utilization of phosphorous and crude protein in broiler chickens fed on rice by-products based diets. **Int. J. Poult. Sci**, v. 4, n. 1, p. 990-993, 2005.
- BARUAH K. et al. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 8, p. 803-812, 2005.
- BARUAH, K. et al. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 238-249, 2007.
- BARROS, M. M. et al. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed  $\beta$ -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish & Shellfish immunology**, v.39, n. 2, p. 188-195, 2014.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.
- BOLS, N. C. et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n.8, p. 853-873, 2001.
- BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Secretaria de apoio rural e cooperativismo. Instrução normativa nº 13, de 30 de Novembro de 2004. **Sistema de legislação agrícola federal**. Brasília: MAPA, 2004. Disponível em <HTTP://estranet.agricultura.gov.br/sislegis> Acesso em 12 de Janeiro. 2016.
- CARNEIRO, D.J. **Efeito da temperatura na exigência de proteína e energia em dietas para alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 1990. p. 55. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1990.
- CASTILLO, S. et al Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, v. 433, p. 6 -12, 2014.

CHO, C. et al. **Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development**. Ottawa: IDRC, 1985. 154 p.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R. et al. Tempo de trânsito gastrintestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Animal Sciences**, v. 27, n. 3, p. 413-417, 2005.

DIBNER, J. J.; & BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal Appl. Poultry Research**, v. 1, n. 23, p. 453 - 463, 2002.

EWING, W. N.; COLE, D. J. A. **The living gut: an introduction to microorganisms in nutrition**. [S.l.]: Leicestershire, 1994.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>>. Acesso em: 29 Novembro 2015.

FEFANA. Organic Acids in Animal Nutrition. European association of specialty feed ingredients and their mixtures, Working Group Organic Acids, FEFANA, Brussels, Belgium. 2014. pp. 97

FREITAG, M. & C. LÜCKSTÄDT, Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: **Acidifiers in animal nutrition: a guide for feed preservation and acidification to promote animal performance**. p. 1-11. 2007.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v.13, p. 209-234, 1995.

GUEGUEN, L. Les critères de qualité nutritionnelle des compléments minéraux en alimentation animale. **Bull. Soc. sci. Hyg. aliment**, v. 58, p. 116-129, 1970.

HALL, G. A. B., & DD, L. J.. Efeito da fonte de fosforo e tempo de incubacao na solubilidade do fosforo em acido citrico a 2% e em fluido de rumem. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 7, n.1, p. 14-25, 1978.

HASSAN, M. S. Effect of dietary organic salts on growth, nutrient digestibility, mineral absorption and some biochemical indices of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus* L. fingerlings. **World Applied Sciences Journal**, v. 29, n. 1, p. 47-55, 2014.

HOSSAIN, M. et al. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream (*Pagrus major*). **Fisheries Science**, v. 73, p.1309-1317, 2007.

HUSSAIN, S. M. et al. Mineral digestibility of Labeo rohita fingerlings fed on cottonseed meal based diets supplemented with citric acid and phytase enzyme. **International Journal of Biosciences**, v. 8, n. 2, p. 25-35, 2016.

IBGE. **Produção da agropecuária municipal**. Ministério de planejamento. Rio Janeiro, p. 1-108. 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Editora Guanabara: 10ª edição, Rio de Janeiro 2006.

KHAJEPOUR, F. & HOSSEINI, S. A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 407-411, 2012.

KOH, C. B. et al. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and resistance to *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture research**, v. 47, p. 357-369, 2014.

LEHNINGER, A.L. et al. Principles of biochemistry. New York: worth Publishers, 1232p, 2007.

LIM, C. et al. Review: use of organic acids, salts in fish diets. **Global Aquaculture Advocates**, v. 5, p. 45–46, 2010.

LÜCKSTÄDT, C. **Acidifiers in animal nutrition**. [S.l.]: Nottingham University Press, 2008, p. 96.

LÜCKSTÄDT, C. Effect of dietary potassium diformate on the growth and digestibility of Atlantic salmon *Salmo salar*. Proceedings of the thirteenth **International Symposium on Fish Nutrition and Feeding**; June 1–5, Florianopolis, Brazil. pp. 179, 2008.

MAIORKA, A. et al. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascorbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 31-37, 2004.

MELO D. C. et al. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. **Arq. bras. med. vet. Zootec**, v. 61, n. 5, 1183-1190. 2009.

METZLER, B & MOSENTHIN, R. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: LÜCKSTÄDT, C. **Acidifiers in animal nutrition**. 1st ed.: Nottingham University Press, Nottingham, UK; p.1– 11, 2007.

MOURA, G.S. et al. Desempenho e atividade de lipase em tilápias do Nilo. **Archivos de zootecnia**, v. 61, n. 235, p. 367-374, 2012.

MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. **Advances in Pork Production**, v. 16, p. 169-182, 2005.

NICODEMO, M. L. F., & BARROCAS, G. E. G. Métodos “*in vitro*” para avaliação de fontes de fósforo destinadas a bovinos. **Rev. Soc. Bras. Zootec**, v. 24, n. 1, p. 49-61, 1995.

NG, W.K. et al. Effects of organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 1451-1466, 2009.

NG, W. & KOH, C. B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-27, 2016.

PARTANEN, K.H., & MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 117-145, 1999.

PROSZKOWIEC-WEGLARZ, M; ANGEL, R. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility<sup>1</sup>. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 609-627, 2013.

RABIA, S. et al. Nutrient digestibility performance by rohu (*Labeo rohita*) juveniles fed acidified and phytase pre-treated sunflower meal-based diet. **Journal of Applied Animal Research**, p.1-5. 2016.

SAKATA, T. et al. Effects of n-butyric acid on epithelial cell proliferation of pig colonic muco in short-term culture. **Dtsch Tierartztl Wochenschr**, n. 102, p. 163–164, 1995.

SARKER M.S.A. et al. Inclusion of citric acid and/or acid-chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 262, p. 436- 443, 2007.

SHAH, S. Z. H. et al. Prospects of Using Citric Acid as Fish Feed Supplement. **Biol**, v. 17, n. 1, p. 8, 2015.

SILVA, B. C. et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, p.104–110. 2013.

SILVA, S. S. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 4 378 ed., Viçosa. 2005.

SUGIURA, S.H. et al. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. **Aquaculture**, v. 160, n. 3, p. 283-303, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. **Aspectos Biológicos, Fisiológicos e Sanitários de Organismos Aquáticos**. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. [Vol. 1]. São Carlos: Pedro & João Editores, 429p. 2015.

THOMAS, J.S. Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Eds.) 898 Schalm's veterinary hematology. 5. ed. Philadelphia: Edgarder Blücher, p.891-898, 2000.

VIELMA, J. Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 5, p. 65–71, 1999.

YOSHIDA, M. et al. Solubility of phosphorus in citric acid solution as an index of biological availability. **Jpn. Poult. Sci**, v. 16, p. 290-292, 1979,

YOUNES, H. et al. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 301-314, 1996.

ZHANG, H. et al. Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. **Aquaculture**, v.453, p.147-153. 2016.

ZHU, Y. et al. The effects of concurrent supplementation of dietary phytase, citric acid and vitamin D3 on growth and mineral utilization in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, v. 436, p.143–150, 2015.

## **LISTAS DE TABELAS**

Tabela 1. Formulação e composição bromatológica das rações

Ingredientes	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Farelo de soja	59,5	59,8	60,2	60,6	60,9
Fubá de milho	22,7	20,8	18,8	16,8	14,8
Farelo de trigo	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja	2,45	3,10	3,70	4,33	4,97
Fosfato bicálcico	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
Lisina	0,10	0,09	0,09	0,08	0,08
Metionina	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
Cloreto de sódio (NaCl)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Ácido cítrico	-	1,00	2,00	3,00	4,00
Suplemento vitamínico e mineral	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT <sup>2</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição das dietas					
Energia Digestível (kcal/kg) <sup>1</sup>	3100,00	3100,00	3100,00	3100,00	3100,00
Proteína Digestível (%) <sup>1</sup>	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00
Proteína Bruta (%) <sup>2</sup>	30,61	30,59	30,60	30,61	30,58
Metionina (%) <sup>1</sup>	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Lisina (%) <sup>1</sup>	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
Extrato etéreo (%) <sup>2</sup>	5,59	6,34	6,89	7,65	8,16
Fibra bruta (%) <sup>2</sup>	3,99	4,75	4,87	5,24	4,49
Cálcio (%) <sup>1</sup>	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18
Fósforo disponível (%) <sup>1</sup>	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70

Suplemento mineral e vitamínico: (Composição/kg de ração) Selênio: 75,00 mg, ferro: 15g, cobre: 2.000,00 mg, cloreto de colina 125,00 g, manganês: 3750,00 mg, zinco: 20,00 g, ferro: 15,00, iodo: 125,00 mg, niacina: 7.800,00 mg, ácido fólico: 750,00 mg, ácido pantotênico: 3.750,00 mg, biotina: 125,00 mg, vitamina C 53,00 g, Iodo: 125,00 g, vitamina A: 2.000.000,00 UI I, vitamina D3, 500.000,00 UI, vitamina E 15.000,00 UI, vitamina K3, 1.000,00 mg, vitamina B1 2.500,00 mg, vitamina B2: 2.500,00 mg, vitamina B6: 2.000,00 mg, vitamina B12: 5.000,00 mg, <sup>2</sup> Butil-hidroxi-tolueno. Valores digestíveis foram estimados baseados nos valores indicado por Furuya et al. (2010). Valores determinados<sup>2</sup>

Tabela 2. Valores médio e desvio padrão do pH da dieta, do estômago e intestino de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com ácido cítrico

pH	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Ração	6,00±0,01 <sup>a</sup>	4,90±0,01 <sup>b</sup>	4,56±0,0 <sup>c</sup>	4,22±0,0 <sup>d</sup>	4,01±0,03 <sup>e</sup>
Estômago	5,50±1,0	5,53±0,25	5,91±0,22	5,76±0,18	5,93±0,53
Intestino	6,30±0,10	6,62±0,12	6,53±0,05	6,52±0,12	6,51±0,12

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de desempenho dos juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com ácido cítrico.

Parâmetros	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
PI (g)	15,1±0,90	13,9±1,07	15,4±0,50	13,5±1,00	14,9±1,62
GP (g)	41,8±2,35	41,5±1,96	41,7±3,28	40,1±3,92	41,1±1,79
CR	47,7±2,35	49,6±3,49	49,7±3,12	48,1±0,52	47,9±1,01
CA	1,14±0,06	1,19±0,07	1,18±0,10	1,22±0,11	1,16±0,04
TCE	3,98±0,04	3,96±0,03	3,98±0,06	3,91±0,07	3,97±0,03
TEP	3,13±0,15	3,01±0,17	3,05±0,26	2,96±0,28	3,08±0,11
TRP	30,8±3,9	30,9±3,42	31,9±9,5	31,6±5,3	30,1±5,9

Peso inicial (PI), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência proteica (TEP), taxa de retenção proteica (TRP). Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 4. Composição corporal dos juvenis de tilápia alimentados com rações suplementadas com ácido cítrico

Parâmetros	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Umidade (%)	74,7±4,20	78,3±0,90	79,6±3,12	77,1±1,46	76,2±0,82
Cinzas (%)	5,45±0,42	5,06±0,14	5,12±0,12	5,07±0,54	5,03±0,10
Proteína bruta (%)	18,7±3,92	17,4±0,5	15,0±2,83	16,9±0,91	17,4±1,56

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).



Tabela 5. Variáveis sanguíneas dos juvenis de tilápia alimentados com rações suplementadas com ácido cítrico

Parâmetros	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	8,7±1,4	8,0±0,6	8,1±1,21	8,0±0,68	8,1±1,19
Hematócrito (%)	31,7±62	31,3±23	30±41	29±47	27±49
CHCM (%)	27,5±2,1	24,8±2,4	26±3,4	27,7±5,3	28,8±2,3
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	1,73±0,4	1,39±0,3	1,13±0,18	1,45±0,28	1,18±0,05
Leucócitos (µL <sup>-1</sup> )	23,2±11,2 <sup>b</sup>	46,2±30,5 <sup>a</sup>	37±1,8 <sup>ab</sup>	45,6±26,2 <sup>a</sup>	32,1±18,5 <sup>b</sup>
PPT (mg dL <sup>-1</sup> )	3,2±0,4 <sup>b</sup>	4,9±0,8 <sup>a</sup>	3,9±0,7 <sup>ab</sup>	4,3±0,9 <sup>a</sup>	3,7±0,4 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 6. Valores médios dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), e demais nutrientes das rações suplementadas com ácido cítrico para juvenis de tilápia-do-nilo. Valores em % da matéria seca

CDA (%)	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Matéria seca	77,60±0,50	78,70±3,70	73,81±2,60	78,83±1,40	73,71±5,40
Proteína bruta	90,60±1,20	91,50±0,70	87,10±2,60	90,03±1,00	86,10±3,30
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	80,80±1,00	81,30±1,80	77,90±2,50	81,50±1,10	75,30±5,20
Extrato etéreo	80,30±3,00	80,70±1,70	83,60±2,40	84,20±2,00	79,30±2,10
Cinzas	65,58±3,20	65,36±2,40	63,40±1,50	66,35±1,50	60,26±8,50
Fósforo	40,90 ±3,90 <sup>a</sup>	54,28±2,70 <sup>b</sup>	58,28±3,70 <sup>b</sup>	54,21±11,10 <sup>b</sup>	52,09±10,80 <sup>ab</sup>
Cálcio	30,50±6,50 <sup>a</sup>	37,90±5,00 <sup>ab</sup>	44,90±6,00 <sup>b</sup>	30,70±12,50 <sup>ab</sup>	32,20±7,40 <sup>ab</sup>

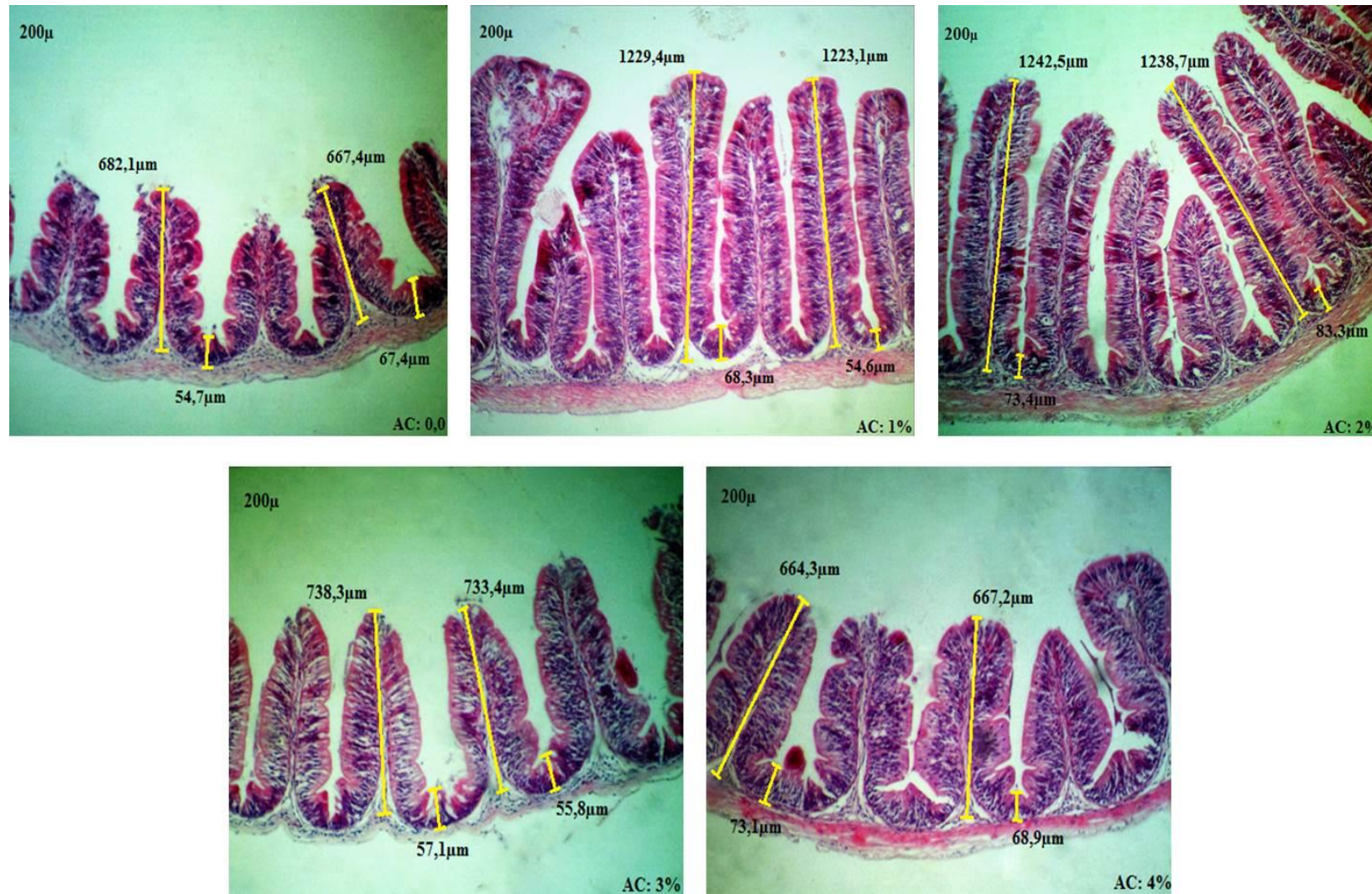
Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 7. Altura de vilosidade (V), profundidade de cripta (C), relação vilosidade:cripta (V:C) e largura dos vilos (L) de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas experimentais durante 40 dias

Parâmetros	Níveis de ácido cítrico (%)				
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
V (µm)	679,7±1,8 <sup>b</sup>	1223,7±45,5 <sup>a</sup>	1243,4±10,7 <sup>a</sup>	733,7±74,7 <sup>b</sup>	681,9±103,7 <sup>b</sup>
C (µm)	59,93±10,3 <sup>c</sup>	66,5±7,9 <sup>bc</sup>	82,1±12,0 <sup>a</sup>	75,0±8,7 <sup>ba</sup>	68,1±5,6 <sup>abc</sup>
V:C	11,3±1,8 <sup>b</sup>	19,9±1,3 <sup>a</sup>	16,3±3,1 <sup>a</sup>	9,9±1,7 <sup>b</sup>	9,7±0,9 <sup>b</sup>
L (µm)	229,9±26,3 <sup>b</sup>	244,0±18,3 <sup>ab</sup>	275,1±13,1 <sup>a</sup>	263,3±13,8 <sup>b</sup>	259,1±46,9 <sup>ab</sup>

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,01).

## **ANEXO**



1

2 Figura 01. Cortes histológicos das microvilosidades intestinais de juvenil de tilápia-do-nilo alimentado com diferentes níveis de suplementação  
 3 do ácido cítrico durante 40 dias. Visualizado no aumento de 40 x no microscópio.

## **CAPITULO-III**

### **Considerações finais**

Os estudos sobre os efeitos dos ácidos orgânicos na saúde dos animais aquáticos são recentes e melhorias têm sido relacionadas com a redução da microbiota patogênica no trato gastrointestinal. Dessa forma, investigações sobre os efeitos dos ácidos orgânicos na saúde dos peixes podem ser avaliados, levando em consideração alguns resultados do presente estudo, que pode ser considerado um dos pioneiros no uso do ácido cítrico como aditivo zootécnico em dietas para tilápia-do-nilo.